

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C07K 14/47, C12N 15/12		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/46245 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 10. August 2000 (10.08.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/00776		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 1. Februar 2000 (01.02.00)		(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): SCHERRING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstrasse 178, D-13353 Berlin (DE).	
(30) Prioritätsdaten: 199 05 128.3 1. Februar 1999 (01.02.99) DE 199 49 436.3 8. Oktober 1999 (08.10.99) DE		(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): CHRISTOPHERS, Enno [DE/DE]; Schlossgarten 12, D-24105 Kiel (DE). HARDER, Jürgen [DE/DE]; Esmarchstrasse 55, D-24105 Kiel (DE). SCHRÖDER, Jens [DE/DE]; Kleiner Bornkrug 7, D-24241 Blumenthal (DE).	
(54) Title: HUMAN ANTIBIOTIC PROTEINS			
(54) Bezeichnung: HUMANE ANTIBIOTISCHE PROTEINE			
(57) Abstract			
The invention relates to proteins, notably SAP-2 and SAP-3, having an antibiotic action. The invention also relates to a method for purifying certain antimicrobial proteins, as well as to a use of said antimicrobial proteins for antibiotic therapy or to a use of cells which were transfected with a DNA which codes for the proteins provided for in the invention.			
(57) Zusammenfassung			
Die Erfindung betrifft Proteine, die antibiotisch wirksam sind. Es handelt sich um SAP-2 und SAP-3. Weiterhin umfasst die Erfindung ein Verfahren zur Reinigung von bestimmten antimikrobiellen Proteinen. Darüber hinaus bezieht sich die Erfindung auf eine Verwendung der antimikrobiellen Proteine zur antibiotischen Behandlung oder auf eine Verwendung von Zellen, welche mit einer DNA transfiziert wurden, die für die erfindungsgemässen Proteine kodiert.			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Human antibiotic Proteine

Die Erfindung betrifft Proteine / Peptide (Proteine), die antibiotisch wirksam sind. Weiterhin umfaßt die Erfindung ein Verfahren zur Reinigung von bestimmten 5 antibiotischen Proteinen. Darüber hinaus bezieht sich die Erfindung auf eine Verwendung der Proteine zur antibiotischen Behandlung oder auf eine Verwendung von Zellen, welche mit einer DNA transfiziert wurden, die für die antibiotischen Proteine kodiert.

10

STAND DER TECHNIK:

Pathogene Mikroorganismen befinden sich gewöhnlich auf der Oberfläche von Epithelien. Dort haften sie an und vermehren sich. Gelegentlich dringen sie auch 15 in tiefere Gewebsschichten ein. Da die Immunantwort gegen diese pathogenen Mikroorganismen langsam einsetzt, ist es nicht verwunderlich, daß die Epithelzellen über eine Abwehr verfügen, mit Hilfe von sezernierten antimikrobiellen Substanzen gegen die Mikroorganismen vorzugehen. Einige dieser Substanzen führen zu einer Mangelernährung bei den Mikroorganismen, andere töten die Mikroorganismen ab, indem Strukturen der Mikroorganismen 20 zerstört werden.

Die Epithelien von Säugern sind normaler Weise nicht infiziert. Dennoch ist die Hautoberfläche von Bakterien und Pilzen dicht besiedelt. Es handelt sich dabei um haut - spezifische Mikroorganismen, die, wenn sie unter Kontrolle stehen, nicht pathogen sind.

25 Das erste bekannte, epithiale β - Defensin, das die Luftröhre der Rinder schützt, ist TAP, welches 64 Aminosäuren besitzt. (D.G. ZASLOFF et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 88, p 3952 – 3956). Dieses TAP vom Rind wirkt anti - bakteriell gegen *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* bei einer minimalen Inhibitionskonzentration von 30 12 – 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Auch *Candida albicans* wird zerstört. Hierbei handelt es sich um ein Protein, welches gewebespezifisch exprimiert wird.

Ein weiteres β - Defensin schützt die Zunge von Rindern, nämlich LAP, welches eine hohe Homologie zu TAP aufweist. (B.S. SCHONWETTER et al. (1995) Science Vol. 267, p 1645 – 1648)

35 Erst 1995 wurde das erste humane β - Defensin gefunden, welches hBD-1 genannt wird. (K.W. BENNSCH et al. (1995) FEBS Lett, Vol. 368, p 331 – 335) So besitzt hBD-1 eine anti - bakterielle Wirkung gegen Gram – negative Bakterien bei einer Konzentration von 60 bis 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. (M. GOLDMAN et al. (1997) Cell.

Vol. 88, p 553 – 560) hBD-1 wird dominant in den Nieren exprimiert, jedoch auch andere epitheliale Gewebe sekretieren hBD-1.

Unabhängig von diesen Untersuchungen war von Interesse, was die Haut normalerweise gesund hält und warum die Haut selten infiziert wird. Das zweite 5 beim Menschen isolierte β - Defensin war das hBD-2, das aus 41 Aminosäuren besteht. (J. HARDER et al. (1997) Nature, Vol. 387, p 861) hBD-2 wirkte sehr effektiv gegen Gram – negative Bakterien mit einer LD₉₀ von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, wogegen bei Gram – positiven Bakterien der Wert bei über 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ liegt. Das hBD-2 ist ein induzierbares Peptid, welches selbst durch einige hitzeinaktivierte Bakterien 10 induziert werden kann.

Ein weiteres humanes antibiotisches Protein ist das ALP, ein Proteaseinhibitor (J.A. KRAMPS et al. (1988) Biol. Chem. Hoppe Seyler, Vol 369, p 83 – 87), das von Keratinozyten produziert wird und sich gegen einige Bakterien und Pilze richtet.

15

Die Angriffe der antibiotischen Protein sind sehr unterschiedlich. Eine Interaktion mit der Membran der Mikroorganismen sind üblich. Lipophile Strukturen vieler antibiotischer Protein und der Defensine sprechen für ein Interalieren in den Membranen oder ein Penetrieren der Membranen. Die antimikrobiellen Proteine 20 und Peptide wirken erst in den Mikroorganismen selbst toxisch.

AUFGABEN UND LÖSUNG:

Aufgabe der Erfindung ist es, weitere humane, antibiotische Proteine und deren 25 Derivate anzubieten, welche wirksam gegen Mikroorganismen, insbesondere gegen Gram - negative und Gram - positive Bakterien, gegen Pilze und gegen Viren einsetzbar sind.

SEQUENZEN DER REIFEN PROTEINE

30 Die Aufgabe wird gelöst durch mindestens ein Protein,

- das als aktives, reifes Protein / Peptid (Protein) einer der folgenden Sequenzen aufweist:
 - SEQ ID NO: 1 (Sequenz Protokoll Nr. 1) (SAP-2); oder
 - SEQ ID NO: 2 (Sequenz Protokoll Nr. 2) (SAP-3);

35 oder

- das als aktives, reifes Protein allelische Modifikationen einer der zuvor unter a) genannten Aminosäure - Sequenzen aufweist, wobei mindestens eine Aminosäure der Aminosäure - Sequenz substituiert, deletiert oder

insertiert ist, ohne dabei die Aktivität des aktiven Proteins wesentlich zu beeinflussen,

oder

5 c) das als aktives, reifes Protein posttranskriptionale Modifikationen einer der Sequenzen unter a) und b) aufweist, die nicht wesentlich die Aktivität des aktiven Proteins beeinflussen.

Vorteilhaft ist ein erfindungsgemäßes Protein, das antimikrobiell und / oder antibiotisch wirksam ist.

10

Vorteilhaft ist ein erfindungsgemäßes Protein,
das antimikrobiell oder antibiotisch wirksam ist und
das eine Mobilität von 6 kDa in der SDS – Gelelektrophorese aufweist.

15

Mehr bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Protein, das eine antibiotische Aktivität gegen *Escherichia coli* oder *Staph. aureus* in einer Konzentration von weniger als 100 µg/ml aufweist.

20

In der Literatur soll in Zukunft die Bezeichnung SAP-2 durch RNase 7 ersetzt werden, und der Begriff SAP-3 soll in Zukunft durch hBD-3 substituiert werden.

Sehr bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Protein, welches ein mit der humanen Aminosäure – Sequenz versehenes Protein ist (vgl. SEQ ID NO: 1 bis 2).

25

Zu SEQ ID NO: 1

Alle allelischen Modifikationen, die die Substitutionen, die Deletionen und/oder die Insertionen von bis zu 30 Aminosäuren umfassen, gehören zur Gruppe der erfindungsgemäßigen Proteine des SEQ ID NO: 1. Bevorzugt sind Deletionen, 30 Substitutionen und/oder Insertionen von bis zu 20 Aminosäuren, mehr bevorzugt von bis zu 10 Aminosäuren, am meisten bevorzugt sind die Deletionen, Substitutionen und / oder Insertionen von einer, zwei, drei, vier, fünf, sechs, sieben, acht oder neun Aminosäuren. Die allelischen Modifikationen sind nicht auf die natürlich vorkommenden Allele begrenzt, vielmehr sind auch im Labor entstandene (nicht in der Natur selbst vorkommende) Veränderungen der Aminosäure – Sequenz möglich.

Zu SEQ ID NO: 2

Alle allelischen Modifikationen, die die Substitutionen, die Deletionen und / oder die Insertionen von bis zu 10 Aminosäuren umfassen, gehören zur Gruppe der erfindungsgemäßen Proteine des SEQ ID NO: 2. Bevorzugt sind Deletionen, Substitutionen und/oder Insertionen von bis zu 6 Aminosäuren, mehr bevorzugt von bis zu 4 Aminosäuren, am meisten bevorzugt sind die Deletionen, Substitutionen und / oder Insertionen von einer, zwei oder drei Aminosäuren. Auch hier gilt die zuvor erwähnte Erweiterung auf Veränderungen, die neben den natürlich vorkommenden auch die künstlich herstellbaren umfassen.

10

SEQUENZEN DER REIFEN PROTEINE MIT SIGNALSEQUENZ

Die Aufgabe wird weiterhin gelöst durch mindestens ein Protein, das eine Signalsequenz und ein reifes erfindungsgemäßes Protein umfaßt,

d) wobei das Protein eine der folgenden Sequenzen aufweist:

15

- (i) SEQ ID NO: 3 (PreSAP-2); oder
- (ii) SEQ ID NO: 4 (PreSAP-3);

oder

e) wobei das Protein allelische Modifikationen einer der zuvor unter d) genannten Aminosäure - Sequenzen aufweist, wobei wenigstens eine Aminosäure der Aminosäure - Sequenz substituiert, deletiert oder insertiert ist, ohne dabei die Aktivität des reifen aktiven Proteins wesentlich zu beeinflussen,

oder

20

f) wobei das Protein posttranskriptionale Modifikationen einer der Sequenzen unter d) und e) aufweist, die nicht wesentlich die Aktivität des aktiven reifen Proteins beeinflussen.

Zu SEQ ID NO: 3

25

Alle allelischen Modifikationen, die die Substitutionen, die Deletionen und/oder die Insertionen von bis zu 35 Aminosäuren umfassen, gehören zur Gruppe der erfindungsgemäßen Proteine des SEQ ID NO: 3. Bevorzugt sind Deletionen, Substitutionen und/oder Insertionen von bis zu 23 Aminosäuren, mehr bevorzugt von bis zu 12 Aminosäuren, am meisten bevorzugt sind die Deletionen, Substitutionen und / oder Insertionen von einer, zwei, drei, vier, fünf, sechs, sieben, acht oder neun Aminosäuren. Die allelischen Modifikationen sind nicht auf die natürlich vorkommenden Allele begrenzt, vielmehr sind auch im Labor entstandene (nicht in der Natur selbst vorkommende) Veränderungen der Aminosäure – Sequenz möglich.

Zu SEQ ID NO: 4

Alle allelischen Modifikationen, die die Substitutionen, die Deletionen und / oder die Insertionen von bis zu 13 Aminosäuren umfassen, gehören zur Gruppe der erfindungsgemäß Proteine des SEQ ID NO: 4. Bevorzugt sind Deletionen,

5 Substitutionen und/oder Insertionen von bis zu 8 Aminosäuren, mehr bevorzugt von bis zu 6 Aminosäuren, am meisten bevorzugt sind die Deletionen, Substitutionen und / oder Insertionen von einer, zwei, drei, vier oder fünf Aminosäuren. Auch hier gilt die zuvor erwähnte Erweiterung auf Veränderungen, die neben den natürlich vorkommenden auch die künstlich 10 herstellbaren umfassen.

Am meisten bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Protein, das ein rekombinan-tes Protein ist. Dabei können die Proteine glykosiliert sein, wenn es sich um SAP-2 oder eine Variante davon handelt.

15 Die erfindungsgemäß Proteine umfassen die reifen Proteine und die ent-sprechenden Vorläuferproteine, welche sich aus einer Signalsequenz und der Sequenz des reifen Proteins zusammensetzen. Dabei geht die Signalsequenz der Sequenz des reifen Proteins voraus. Das reife Protein beginnt mit der zuvor 20 genannten N - terminalen Sequenz unter Punkt a). Die Signalsequenz ist für die Durchdringung des endoplasmatischen Retikulums erforderlich

Ebenfalls ist es möglich, an den N - Terminus und / oder C - Terminus Schutzgruppen zu synthetisieren, welche aus der Peptidchemie bekannt sind.

25 Die **Schutzgruppe** des N - Terminus kann bestehen aus:

Alkyl-, Aryl-, Alkylaryl-, Aralkyl-, Alkylcarbonyl- oder Arylcarbonylgruppen mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen, bevorzugt sind Naphthoyl-, Naphthylacetyl-, Naphthylpropionyl-, Benzoylgruppe oder einer Acylgruppe mit 1 bis 7 Kohlenstoffatomen.

30 Die **Schutzgruppe** des C - Terminus kann bestehen aus:

Einer substituierte oder unsubstituierte Alkoxy- oder Aryloxygruppe mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen oder aus einer Aminogruppe.

Weitere **Schutzgruppen** - sowohl für den N - Terminus als auch für den C - Terminus - sind in Houben-Weyl (1974) Georg Thieme Verlag, 4. Auflage

beschrieben. Die Beschreibung der Schutzgruppen in der zitierten Literaturangabe ist Teil der Offenbarung.

Die Sequenz des erfindungsgemäßen Protein kann am N - terminalen und / 5 oder C - terminalen Ende an Stelle einer Schutzgruppe mit weiteren **Rahmen - Aminosäure - Sequenzen** (analog zu der Definition von „frame work“ bei Antikörpern) verbunden sein. Diese weiteren Rahmen - Aminosäure - Sequenzen sind für die Bindung des erfindungsgemäßen Protein nicht wesentlich, sie können jedoch Träger von anderen Funktionen sein, so zum 10 Beispiel Chelate oder auch zytostatische oder zytotoxische Sequenzen umfassen. Derartige Rahmen - Aminosäure - Sequenzen treten in der Natur auf. Es kann sich dabei zum Beispiel um die zwischen den hypervariablen Bereichen angeordneten Sequenzen des variablen Bereichs eines Antikörper handeln. Diese Sequenzen werden als "Frame - Work" (Rahmensequenzen) 15 bezeichnet. Als Rahmen - Aminosäure - Sequenzen sind weiterhin nicht abgespaltene Teil- Signalsequenzen eines sezernierten eukaryotischen Proteins bekannt, wobei das Protein in einem Bakterium exprimiert wird. Derartige Signalsequenzen haben bisweilen keinen Einfluß auf die Funktion des nachfolgenden Proteins. Ebenfalls ist es möglich, erfindungsgemäße Proteine 20 hintereinander zu koppeln, wobei Rahmen - Aminosäure - Sequenzen zwischen den Einzelsequenzen angeordnet sind.

Um im Einzelfall zu entscheiden, ob ein bestimmtes erfindungsgemäßes Protein mit wenigstens einer Rahmen - Aminosäure - Sequenz und/oder wenigstens 25 einer Schutzgruppe zum Gegenstand der Erfindung zählt, ist ein Vergleich zwischen

- (i) diesem Protein **mit** Rahmen - Aminosäure - Sequenz und/oder **mit** Schutzgruppe und
- (ii) demselben Protein **ohne** Rahmen - Aminosäure - Sequenz und **ohne** 30 Schutzgruppe

anzustellen. Dabei sollten beide verglichenen Moleküle im wesentlichen dieselben Funktionen der Inhibierung oder Bindung aufweisen.

cDNA ODER DNA KODIEREND FÜR DIE ERFINDUNGSGEMÄßen PROTEINE

Die Erfindung umfaßt weiterhin auch eine cDNA oder DNA,

aa) wobei die cDNA oder DNA eine der folgenden Aminosäure - Sequenzen
5 kodiert:

- (i) SEQ ID NO: 1 (SAP-2);
- (ii) SEQ ID NO: 2 (SAP-3);
- (iii) SEQ ID NO: 3 (PreSAP-2); oder
- (iv) SEQ ID NO: 4 (PreSAP-3)

10 oder

bb) wobei die cDNA oder DNA allelische Modifikationen einer der Aminosäure - Sequenzen unter aa) kodiert,

worin wenigstens eine Aminosäure der Aminosäure - Sequenz substituiert, deletiert oder insertiert ist, ohne dabei die Aktivität des aktiven Proteins wesentlich zu beeinflussen.

15

Bevorzugt sind cDNA und DNA, die ein reifes erfindungsgemäßes Protein kodieren.

20 Die allelischen Modifikationen sind zuvor unter dem Punkt "Sequenzen der reifen Proteine" definiert worden.

Zu SEQ ID NO: 1 und 3

Alle allelischen Modifikationen, die die Substitutionen, die Deletionen und/oder die Insertionen von bis zu 90 Nukleotiden umfassen, gehören zur Gruppe der erfindungsgemäßen DNAs der SEQ ID NO: 1 und 3. Bevorzugt sind Deletionen, Substitutionen und/oder Insertionen von bis zu 60 Nukleotiden, mehr bevorzugt von bis zu 30 Nukleotiden, am meisten bevorzugt sind die Deletionen, Substitutionen und / oder Insertionen von einer, zwei, drei, vier, fünf, sechs, sieben, acht oder neun oder 10 bis 29 Nukleotiden. Die allelischen Modifikationen sind nicht auf die natürlich vorkommenden Allele begrenzt, vielmehr sind auch im Labor entstandene (nicht in der Natur selbst vorkommende) Veränderungen der Aminosäure – Sequenz möglich.

Zu SEQ ID NO: 2 und 4

35 Alle allelischen Modifikationen, die die Substitutionen, die Deletionen und / oder die Insertionen von bis zu 30 Nukleotiden umfassen, gehören zur Gruppe der erfindungsgemäßen DNAS der SEQ ID NO: 2 und 4. Bevorzugt sind Deletionen, Substitutionen und/oder Insertionen von bis zu 18 Nukleotiden,

mehr bevorzugt von bis zu 12 Nukleotiden, am meisten bevorzugt sind die Deletionen, Substitutionen und / oder Insertionen von einer, zwei oder drei oder 4 bis 11 Nukleotiden. Auch hier gilt die zuvor erwähnte Erweiterung auf Veränderungen, die neben den natürlich vorkommenden auch die künstlich herstellbaren umfassen.

Weiterhin umfaßt die Erfindung eine cDNA oder DNA,

cc) wobei die cDNA oder DNA eine der folgenden Nukleotidsequenzen aufweist:

10 (i) SEQ ID NO: 5 (cDNA-SAP-2)
(ii) SEQ ID NO: 6; (cDNA-SAP-3);

oder

dd) wobei die cDNA oder DNA eine allelische Modifikation einer der Nukleotidsequenzen unter cc) aufweist, wobei wenigstens ein Nukleotid substituiert, 15 deletiert oder insertiert ist, ohne dabei die Aktivität des Proteins, das von der allelischen Modifikation der Nukleotidsequenz unter cc) kodiert wird, wesentlich zu beeinflussen.

Zu SEQ ID NO: 5

20 Alle allelischen Modifikationen, die die Substitutionen, die Deletionen und/oder die Insertionen von bis zu 90 Nukleotiden umfassen, gehören zur Gruppe der erfindungsgemäßen DNAs des SEQ ID NO: 5. Bevorzugt sind Deletionen, Substitutionen und/oder Insertionen von bis zu 60 Nukleotiden, mehr bevorzugt von bis zu 30 Nukleotiden, am meisten bevorzugt sind die Deletionen, 25 Substitutionen und / oder Insertionen von einer, zwei, drei, vier, fünf, sechs, sieben, acht oder neun oder 10 bis 29 Nukleotiden. Die allelischen Modifikationen sind nicht auf die natürlich vorkommenden Allele begrenzt.

Zu SEQ ID NO: 6

Alle allelischen Modifikationen, die die Substitutionen, die Deletionen und / oder 30 die Insertionen von bis zu 30 Nukleotiden umfassen, gehören zur Gruppe der erfindungsgemäßen DNAs des SEQ ID NO: 6. Bevorzugt sind Deletionen, Substitutionen und/oder Insertionen von bis zu 18 Nukleotiden, mehr bevorzugt von bis zu 12 Nukleotiden, am meisten bevorzugt sind die Deletionen, Substitutionen und / oder Insertionen von einer, zwei oder drei oder 4 bis 11 35 Nukleotiden. Auch hier gilt die zuvor erwähnte Erweiterung auf Veränderungen, die neben den natürlich vorkommenden auch die künstlich herstellbaren umfassen.

Bevorzugt sind cDNA und DNA, die ein erfindungsgemäßes Protein kodieren.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung umfaßt eine cDNA oder DNA,
ee) wobei die cDNA oder DNA eine der folgenden Nukleotidsequenzen
5 aufweist:

- (i) SEQ ID NO: 7 (cDNA-PreSAP-2) oder
- (ii) SEQ ID NO: 8 (cDNA-PreSAP-3),

oder

ff) wobei die cDNA oder DNA eine allelische Modifikation einer der Nukleotidsequenzen unter ee) aufweist, wobei wenigstens ein Nukleotid substituiert, deletiert oder insertiert ist, ohne dabei die Aktivität des Proteins, das von der allelischen Modifikation der Nukleotidsequenz unter ee) kodiert wird, wesentlich zu beeinflussen.

Bevorzugt sind cDNA und DNA, die ein erfindungsgemäßes Präprotein
15 kodieren.

Zu SEQ ID NO: 7

Alle allelischen Modifikationen, die die Substitutionen, die Deletionen und/oder die Insertionen von bis zu 90 Nukleotiden umfassen, gehören zur Gruppe der erfindungsgemäßen DNAs des SEQ ID NO: 5. Bevorzugt sind Deletionen, Substitutionen und/oder Insertionen von bis zu 60 Nukleotiden, mehr bevorzugt von bis zu 30 Nukleotiden, am meisten bevorzugt sind die Deletionen, Substitutionen und / oder Insertionen von einer, zwei, drei, vier, fünf, sechs, sieben, acht oder neun oder 10 bis 29 Nukleotiden. Die allelischen Modifikationen sind nicht auf die natürlich vorkommenden Allele begrenzt.

Zu SEQ ID NO: 8

Alle allelischen Modifikationen, die die Substitutionen, die Deletionen und / oder die Insertionen von bis zu 30 Nukleotiden umfassen, gehören zur Gruppe der erfindungsgemäßen DNAs des SEQ ID NO: 6. Bevorzugt sind Deletionen, Substitutionen und/oder Insertionen von bis zu 18 Nukleotiden, mehr bevorzugt von bis zu 12 Nukleotiden, am meisten bevorzugt sind die Deletionen, Substitutionen und / oder Insertionen von einer, zwei oder drei oder 4 bis 11 Nukleotiden. Auch hier gilt die zuvor erwähnte Erweiterung auf Veränderungen, die neben den natürlich vorkommenden auch die künstlich herstellbaren umfassen.

Alle DNA-Konstrukte zählen auch dann zu den aufgezählten erfindungsgemäßigen Sequenzen, wenn solche Nukleotide ausgetauscht werden, die aufgrund

des degenerierten Kodes dieselbe Aminosäure kodieren. Der Austausch derartiger Nukleotide ist offensichtlich und die sich entsprechenden Aminosäuren sind in jedem Biochemie - Lehrbuch offenbart. (R. KNIPPERS, 1982, 3. Auflage, Molekulare Genetik, Georg Thieme Verlag)

5

Die allelische Modifikationen sind zuvor definiert worden.

Wenn die Aktivität des Proteins angegeben wird, um festzustellen, ob die allelische Modifikation unter die Gruppe der erfindungsgemäßigen Proteine zählt, so ist immer das reife Protein zu messen, auch wenn die Signalsequenz ebenfalls 10 angeführt ist. Sollte die Signalsequenz angegeben sein, so ist die Funktion immer an dem Protein zu messen, das nach Entfernen der Signalsequenz erhalten wird.

Die Aktivität der erfindungsgemäßigen Proteine mißt sich an seiner Funktion, die eine antibiotische Wirkung, eine antimikrobielle Wirkung, und / oder die Bindung 15 an gegen das reife humane Protein gerichtete Antikörper oder Bindungsmoleküle sein kann.

Weiterhin umfaßt die Erfindung Bindungsmoleküle (zum Beispiel Peptide oder deren Derivate), Einzelketten - Proteine (Single Chain Proteins), Antikörper oder 20 Fragmente der Antikörper, die Domänen auf dem reifen, erfindungsgemäßigen Protein spezifisch erkennen. Wenn das gereinigte erfindungsgemäße Protein vorliegt, ist es für den Fachmann leicht möglich, monoklonale Antikörper herzustellen. Dabei wird die bekannte Methode von Köhler und Milstein und deren Weiterführungen angewendet. Im Einzelnen wird in konventioneller Methode 25 eine Maus mit dem gereinigten Protein mehrfach immunisiert, die Milzzellen entnommen und mit geeigneten Tumorzellen fusioniert. Die Hybride werden anschließend selektiert. Die Bindungsmoleküle können als Diagnostikum eingesetzt werden, um zum Beispiel festzustellen, ob der jeweilige Patient an einem Mangel oder einer Variante der erfindungsgemäßigen Proteine leidet.

30

Die Protein der Erfindung können zum Beispiel aus Hornschuppen von Psoriasis Patienten isoliert werden. Die Reinigung erfolgt gemäß der Beispiele. Die Proteine haben die zuvor beschriebene Aminosäure - Sequenzen. Sie haben ein Molekulargewicht von ca. 20000 ± 2000 bei SAP – 2 und 6000 ± 2000 bei SAP – 35 3 (siehe Beispiele). Der isoelektrische Punkt liegt im Bereich von pH 8,5 bis 10,5, wenn die im Beispiel beschriebene Methode angewendet wird.

Die erfindungsgemäßigen Proteine können natürlichen Ursprungs sein. Die Proteine werden gewonnen, indem sie gemäß der Beispiele geerntet und

aufgearbeitet werden. Der Hornschuppenüberstand wird gereinigt und die erfindungsgemäßen Proteine isoliert und angereichert. Alle Anreicherungsstufen der Isolierung und der Reinigung sind Teil der Erfindung. Bevorzugt sind die Anreicherungsstufen der Isolierung und Reinigung, bei denen die erfindungsgemäßen Proteine zu pharmazeutischen Zwecken verwendet werden können. So werden Reinigungen von 50 % der Proteine bezogen auf das Gesamtprotein erzielt, bevorzugt sind 85 %, mehr bevorzugt 95 % und am meisten bevorzugt 99 % der Proteine bezogen auf das Gesamtprotein.

Ebenso ist es möglich, die erfindungsgemäßen Proteine synthetisch herzustellen. Dazu zählt die Proteinsynthese nach J.M. SEWART and J.D. YOUNG, San Francisco, 1969 and J. MEIENHOFER, Hormonal Proteins and Peptides Vol. 2 p 46, Academic Press (New York), 1973 und E. SCHODER and K. LUBKE, The Peptides, Vol. 1, Academic Press (New York) 1965. Die Zitate sind Teil der Offenbarung.

Zu den synthetisch hergestellten Proteinen zählen auch die rekombinanten Proteine, die nach bekannten Verfahren hergestellt werden. Je nach Wirtsorganismus können die erfindungsgemäßen Protein (bei SAP – 2) glykosyliert oder, wenn sie in Prokaryonten synthetisiert werden, unglykosyliert sein.

Die Funktion der Toxizität gegen Mikroorganismen ist in verschiedenen Testsystemen zu ermitteln. In den Beispielen sind gängige Testverfahren beschrieben. (vgl. SELSTED et al. (1993) J. Biol. Chem., Vol. 268, p 6641 – 6648 und GANZ et al. (1985) J. Clin. Invest. Vol. 76, p 1427 – 1435)

Die Proteine der Erfindung wirken antibiotisch gegen Mikroorganismen, insbesondere gegen die Gram - negativen und Gram - positiven Familien, dabei bevorzugt gegen die Arten *E. coli* und *Staphylococcus aureus*.

Die Testsysteme sind ausführlich in Beispiel 3 beschreiben.

VEKTOREN MIT DER ERFINDUNGSEMAßEN DNA

Ein weiterer Teil der Erfindung ist ein Vektor, der eine erfindungsgemäße cDNA oder DNA, weiterhin einen passenden Promotor und gegebenenfalls einen passenden Enhancer enthält. Ebenfalls kann auch noch eine Signal - Sequenz umfaßt sein. Vektoren sind ausführlich in den europäischen Publikationen EP 0 480 651, EP 0 462 632 und EP 0 173 177 beschrieben.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung besteht in einer eukaryontischen oder prokaryontischen Wirtszelle, die mit einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert ist.

Die Erfindung umfaßt weiterhin ein Verfahren zum Herstellen eines erfindungsgemäßen Proteins unter Verwendung einer erfindungsgemäßen Wirtszelle, mit den Schritten:

- Kultivieren der Wirtszelle,
- Anreichern des Proteins, und
- Reinigen des Proteins.

Weiterhin umfaßt die Erfindung ein Verfahren zum Synthetisieren von einem der erfindungsgemäßen Proteine, wobei nach der Festphasen – Methode oder nach der Flüssigphasen – Methode die Proteine synthetisiert werden.

Das Verfahren, bei dem die erfindungsgemäßen Protein hergestellt werden, hat die folgenden Stufen:

das Carboxyl - Ende einer zu koppelnden Aminosäure, deren Aminogruppen und gegebenenfalls funktionellen Gruppen der Seitenkette eine Schutzgruppe tragen, reagiert mit dem freien Amino - Ende der zu koppelnden Aminosäure oder des zu koppelnden Proteinfragments in Gegenwart eines Kondensationsreagenzes,

und

im Falle einer nicht - endständigen Aminosäure wird anschließend die α - Amino - Schutzgruppe der gekoppelten Aminosäure abgespalten und werden weitere Aminosäuren an die zu synthetisierende Protein - Kette nach den zuvor beschriebenen beiden Schritten gekoppelt

oder

im Falle einer endständigen Aminosäure wird gegebenenfalls anschließend die α - Amino - Schutzgruppe der gekoppelten Aminosäure abgespalten

und

- 5 nach Kopplung der letzten Aminosäure im Falle der Festphasen - Methode wird das Protein von der Festphase abgespalten.

ALLELISCHE MODIFIKATIONEN

- 10 Die meisten Deletionen, Insertionen und Substitutionen scheinen keine durchgreifende Änderung in der Charakteristik des Proteins der Erfindung zur Folge zu haben. Da es schwer ist, den genauen Effekt einer Substitution, einer Deletion oder einer Insertion im voraus anzugeben, muß die Funktion des veränderten Proteins mit der Funktion des erfindungsgemäßigen Proteins verglichen
- 15 werden. Die hierfür zu verwendenden Methoden sind in den Beispielen angegeben. Als Standard dient das Protein gemäß der SEQ ID NO: 1 bis 2, ebenfalls auch das Protein, das nach Beispiel 1 oder 2 gereinigt wird, und auch die Reinigungsmethode des Beispiels 1 oder 2 für das Vergleichsprotein.
- 20 Der genetische Code ist degeneriert, das bedeutet, daß die meisten Aminosäuren von mehr als einem Codon aus drei Nukleotiden kodiert werden. Daher führen einige allelische Modifikationen auf der Ebene der Nukleotide nicht zu einer Änderung der Aminosäure - Sequenz. Daher ereignen sich allelische Modifikationen vornehmlich auf der Ebene der DNA und können sich sekundär 25 auf die Aminosäure - Sequenz auswirken.

Die cDNA- oder DNA-Sequenzen, die die erfindungsgemäßigen Proteine kodieren, können gemäß konventioneller Techniken modifiziert werden, um Varianten der erfindungsgemäßigen Proteine herzustellen, die im wesentlichen die gleiche 30 Aktivität wie die beschriebenen und charakterisierten Proteine der Erfindung besitzen. Dabei wird die Aktivität so gemessen, wie es in den Beispielen beschrieben ist. Eine derartige Homologie – Austestung wird in CUNNIGHAM et al. (1989) Science, Vol. 243, p 1330 und O'DOWD et al. (1988) J. Biol. Chem., Vol. 263, p 15985 beschrieben.

35 Aminosäuren können substituiert werden, wobei mit einem Protein- oder Peptid- Mapping die Aminosäuren in ihren Positionen substituiert werden können, wobei anschließend die Aktivität der Modifizierung gemessen wird. Hierbei sind

experimentell ermittelbare Substituierungen möglich, die aufgrund der chemischen Struktur der Seitenketten nicht ohne weiteres voraussagbar ist.

Die Mutationen werden durch die Homologie (Similarity) zweier zum Vergleich
5 anstehender Proteine definiert. Der Ausdruck Homologie umfaßt ähnliche Aminosäuren und Lücken in den Sequenzen der Aminosäuren (Homologie = similarity). Die erfindungsgemäßigen Proteine haben Aminosäure - Sequenzen, die eine Homologie von wenigstens 80 %, bevorzugt 90 %, mehr bevorzugt 95 % und am meisten bevorzugt 98 % der erfindungsgemäßigen Strukturen besitzt,
10 wie sie durch die Sequenzen unter SEQ ID NO: 1 bis 2 oder SEQ ID NO: 3 und 4 definiert sind und wie sie weiterhin nach der Reinigung gemäß der Beispiele erhalten werden.

Sequenzen von Proteinen lassen sich einfach verändern. Dabei werden die
15 Aminosäuren in ihren jeweiligen Positionen ausgetauscht. Gleichzeitig ist notwendig, die so gewonnenen Sequenzen auf ihre Funktion hin zu untersuchen. Der Aminosäure – Austausch kann nach zwei verschiedenen Methoden erfolgen.

Jede der Position eines Proteins wird nacheinander durch Alanin ersetzt.
20 Anschließend wird die Funktion des jeweils um Alanin modifizierten Moleküls gemessen. Weicht der Meßwert von dem des Standard - Proteins ab, so ist diese Aminosäure an dieser Position des Proteins, an der nun ein Alanin angeordnet ist, für die Funktion essentiell. Hierdurch ergibt sich eine Karte des Proteins, aus der die konservativen Positionen und die einer Variation
25 zugänglichen Positionen angegeben sind.

Eine andere Methode besteht darin, jede Position oder wesentliche Positionen einer Proteins gegen alle 20 natürlichen Aminosäuren auszutauschen. Anschließend wird von all diesen Modifikationen die Funktion ausgetestet. Die Methode wird beschrieben in Ronald FRANK (1992) Spot – Synthesis: easy
30 technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. Tetrahedron Vol . 48, No 42, pp 9217 – 9232.

Beide Methoden sind besonders für Peptide geeignet, da diese mit der Festphasensynthese hergestellt werden. Dennoch läßt sich diese Methode mit Leichtigkeit auch für den Fachmann auf Proteine übertragen, wobei die Proteine
35 in Zellen synthetisiert werden. Hierbei ist die Veränderung der DNA wesentlich, die jedoch bei den heutigen Techniken gezielt erfolgen kann.

Das Verfahren zur Modifizierung der Aminosäure – Sequenz kann wie folgt ausgeführt werden:

- (a) Mindestens eine Aminosäure in der Sequenz des Proteins wird durch eine natürliche oder auch gegebenenfalls durch eine nicht natürliche Aminosäure ersetzt.
5
- (b) Das modifizierte Protein wird nach jeder Substituierung auf die antibiotische Funktion gegenüber Mikroorganismen ausgetestet und die am meisten antibiotischen Proteine werden selektiert.
- (c) In einem weiteren Schritt werden die am meisten antibiotischen
10 Proteine mindestens in einem weiteren Zyklus gemäß der Punkte (a) und (b) durchlaufen.

Das Resultat einer solchen Modifizierung kann ein Protein sein, welches mit der ursprünglichen Sequenz nur noch Teile gemeinsam hat.

15 Wie zuvor erwähnt, umfaßt die Erfindung auch Modifikationen der DNA oder cDNA. Diese modifizierten Sequenzen hybridisieren unter stringenten Bedingungen mit den DNA-Sequenzen, die die erfindungsgemäßen Proteine kodieren (siehe Sequenzen unter aa); cc) und ee)). Die cDNA- oder DNA-Sequenzen
20 haben Nukleotid - Sequenzen, die eine Identität einschließlich kurzer (bis 15 Nukleotide) Deletionen und Insertionen von wenigstens 70 %, bevorzugt 82 %, mehr bevorzugt 90 % und am meisten bevorzugt von 95 % mit den erfindungsgemäßen cDNA- oder DNA-Sequenzen besitzen (siehe aa), cc) und ee)). Die
25 Identität einschließlich der kurzen (bis 15 Nukleotide) Deletionen und Insertionen kann durch eine Hybridisierung gemessen werden, wie sie in R. KNIPPERS, Molekulare Genetik, 1982, dritte Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York beschrieben ist. Außerdem sind Standard – Rechenprogramme dem Fachmann bekannt, mit deren Hilfe Homologie zu berechnen ist.

30 Die Erfindung umfaßt weiterhin eine cDNA oder DNA mit mindestens einer der Sequenzen von SEQ ID NO: 5 bis 8,
oder
Nukleotidsequenzen, die mit einer der SEQ ID NO: 5 bis 8 unter selektiven,
35 stringenten Bedingungen hybridisiert.
Stringente Bedingungen liegen dann vor, wenn die Salze, deren Konzentration, die Temperatur die anorganischen und organischen Lösungsmittel in typischer Form kontrolliert werden, wie dieses bei der etablierten Hybridisierungstechnik

praktiziert wird. Stringente Temperatur – Bedingungen schließen Temperaturen von mindestens 30 °C, bevorzugt mindestens 37 °C, mehr bevorzugt mindestens 45 °C, noch mehr bevorzugt mindestens 55 °C, noch vorteilhafter mindestens 65 °C und am meisten bevorzugt mindestens 70 °C ein. Stringente Salzkonzentration umfassen weniger als 1000 mM, bevorzugt weniger als 700 mM, mehr bevorzugt weniger als 400 mM, noch mehr bevorzugt weniger als 300 mM, vorteilhafter weniger als 200 mM und am meisten bevorzugt 150 mM. Die Kombination der Parameter ist wichtiger als der Bezug auf einen einzelnen Parameter. (WETMUR et al. (1968) J. Mol. Biol., Vol. 31, p 349)

10

POSTTRANSLATIONALE MODIFIKATIONEN

Unter den zuvor erwähnten posttranslationalen Modifikationen versteht man Veränderungen, die während oder nach der Translation auftreten. Hierzu zählen die Glykosylierung, die Ausbildung von Disulfid - Brücken, die chemische Modifikationen der Aminosäuren, so zum Beispiel die Sulfatierung, die im Zusammenhang mit dem Hirudin beschrieben ist. (J.W. FENTON (1989) "Thrombin Interactions with Hirudin", Seminars in Thrombosis and Hemostasis Vol. 15, p 265 – 268)

Die Glykosylierung ist eine wesentliche Funktion des endoplasmatischen Retikulums und/oder des Golgi-Apparates. Die Sequenz und die Verästelung der Oligosaccharide wird in dem endoplasmatischen Retikulum gebildet und in dem Golgi-Apparat verändert. Die Oligosaccharide können N-verknüpfte Oligosaccharide (Asparagin-verknüpfte) oder O-verknüpfte Oligosaccharide (Serin-, Threonin- oder Hydroxylysin-verknüpfte) sein. Die Form der Glykosylierung ist von dem produzierenden Zelltyp und von der Art abhängig, von der der entsprechende Zelltyp stammt. Das Ausmaß und die Art der Glykosylierung kann durch Substanzen beeinflußt werden, wie es in der europäischen Publikation EP 0 222 313 beschrieben ist. Die Variation der Glykosylierung kann die Funktion des Proteins verändern.

Proteine bilden häufig kovalente Bindungen innerhalb der Ketten aus. Diese Disulfid - Brücken werden zwischen zwei Cysteinen hergestellt. Dabei wird das Protein spezifisch gefaltet. Die Disulfid - Brücken stabilisieren die dreidimensionale Struktur der Proteine.

35

ISOLIERUNG UND HERSTELLUNG DER ERFINDUNGSGEMÄßen PROTEINE

Die Erfindung umfaßt weiterhin ein Verfahren zur Reinigung von erfindungsgemäßen Proteinen, wobei das Verfahren aus folgenden Schritten besteht:

- (i) Extrahieren der Proteine aus natürlichen menschlichen Epithel – Zellen, transfizierten Zellen oder Hautschuppen oder Zellkulturen, die gegenüber Mikroorganismen gegebenenfalls exponiert wurden,
- (ii) Auftragen des Extraktes auf eine Affinitätssäule mit anschließender Reversed Phase HPLC und Eluieren über einen Salzgradienten, mit Säuren oder organischen Eluenten,
oder
- (iii) Auftragen des Extraktes auf eine HPLC – Säule und Eluieren mit Salzen.

Die Reinigung ist ausführlich in den Beispielen beschrieben.
Bevorzugt ist eine Mikro – Mono S –HPLC – Säule.
Die Proteine werden bevorzugt gemäß Beispiel 1 und 2 gereinigt. Jedoch sind auch andere Isolierungs - und Reinigungsmethoden möglich:

- Methods of Enzymology, Volume 182: Guide to Protein Purification, ed. Murray P. DEUTSCHER, Academic Press, 1990;
- Protein Purification Application - A Practical Approach, ed. E.L.V. HARRIS and S. ANGEL, IRL-Press 1990;
- Protein Purification, Principles and Practice, Ropert SCOPES, Springer-Verlag 1982; and
- Protein Purification, Principles, High Resolution Methods and Applications, ed. H.-C. JANSON and L. RYDEN, VCH publishers 1989.

VERWENDUNG ALS ARZNEIMITTEL

Die Proteine gemäß der Erfindung besitzen pharmakologische Effekte und sind deshalb als pharmazeutische Wirkstoffe verwendbar. Die Erfindung umfaßt ebenfalls ein Arzneimittel, das eines der erfindungsgemäßen Proteine oder ein Gemisch davon enthält. Weiterhin gehört zur Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eines der erfindungsgemäßen Proteine oder ein Gemisch erfindungsgemäßer Proteine enthält, in Gegenwart von pharmazeutisch verträglichen und annehmbaren Verbindungen und Trägern. Ebenfalls umfaßt die Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eines der

pharmazeutisch aktiven, erfindungsgemäßen Proteine oder deren Gemisch und ein pharmazeutisch verträgliches Salz oder einen pharmazeutisch verträglichen Träger enthält.

5 Insbesondere zeigen die erfindungsgemäßen Protein gemäß der SEQ ID NO: 1 bis 2 eine toxische oder antibiotische Wirkung gegenüber Mikroorganismen, insbesondere gegenüber den Gruppen der Gram - negativen und Gram - positiven Bakterien, bevorzugt bei den Arten *E. coli* und *St. aureus*.

Testverfahren sind in dem Beispiel 3 beschrieben.

10 Die Versuchsergebnisse dieser *in vitro* Tests zeigen, daß die erfindungsgemäßen Proteine als Arzneimittel oder zur medizinischen Behandlung verwendet werden können. Diese Versuchsergebnisse lassen sich von den *in vitro* Testsystemen auf ein *in vivo* System übertragen, da es sich bei den Tests um etablierte Versuchsanordnungen handelt. Die Proteine der Erfindung können deshalb zur Behandlung und Prävention von Infektionen durch Mikroorganismen dienen. Die Proteine der Erfindung können als ein antibiotisches Medikament bei Säugern, insbesondere Menschen, zur Behandlung von Infektionen und / oder zur Infektionsprophylaxe eingesetzt werden

20 Die Erfindung liefert weiterhin

(i) die Verwendung eines der erfindungsgemäßen Proteine oder deren Gemisch zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Infektionen, die von Mikroorganismen verursacht wurden oder zur Prävention solcher Infektionen;

25 (ii) ein Verfahren zur Behandlung von Infektionen, die von Mikroorganismen verursacht wurden oder zur Prävention solcher Infektionen, welches Verfahren eine Verabreichung einer Proteinmenge gemäß der Erfindung umfaßt, wobei die Menge die Krankheit unterdrückt, und wobei die Proteinmenge einem Patienten gegeben wird, der ein solches Medikament benötigt;

30 (iii) eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung von Infektionen, die von Mikroorganismen verursacht wurden oder zur Prävention solcher Infektionen,

35 welche Behandlung eines der erfindungsgemäßen Proteine oder deren Gemisch und wenigstens einen pharmazeutisch verträglichen Träger und Zusatz umfaßt.

Für diese therapeutische Wirkung sind unterschiedliche Dosen geeignet. Sie hängen beispielsweise von dem verwendeten Protein, von dem Wirt, von der Art der Verabreichung und von der Art und der Schwere der zu behandelnden Zustände ab. Im allgemeinen sind jedoch bei Tieren zufriedenstellende Resultate zu erwarten, wenn die tägliche Dosen einen Bereich von 2 µg bis 2000 µg pro kg Körpergewicht umfassen. Bei größeren Säugetieren, beispielsweise dem Menschen, liegt eine empfohlenen tägliche Dosis im Bereich von 2 bis 2000 µg pro kg Körpergewicht, wenn das nach Beispiel 1 oder 2 gereinigte Protein verwendet wird. Zum Beispiel wird diese Dosis zweckmäßiger Weise in Teildosen bis zu viermal täglich verabreicht. Die täglich Dosis bei Prävention beträgt ein zehntel der Menge, die bei einer Infektion eingesetzt wird.

Das erfindungsgemäße Protein wird bevorzugt lokal oder epithelial verabreicht, so auch in den oberen und unteren Luftwegen.

Die erfindungsgemäßen Proteine können auf jedem üblichen Weg verabreicht werden, auch in Form von Cremen, Gele, halbfeste Arzneiformen, Suspensionen oder Inhalationslösungen oder Inhalationspulver.

Die vorliegende Erfindung stellt pharmazeutische Zusammensetzungen zur Verfügung, die eines der erfindungsgemäßen Proteine oder deren Gemisch und wenigstens einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Zusatz umfassen. Solche Zusammensetzungen können nach bekannten Verfahren hergestellt werden. Dabei ist auf Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed Mack Publishing Company, East Pennsylvania (1980) hinzuweisen.

Weiterhin sind mit der erfindungsgemäßen DNA oder cDNA transfizierte syngene oder allogene humane Zellen als Medikament einsetzbar, indem diese Zellen auf dem Epithelgewebe aufgetragen werden oder sich in der Matrix eines Wundverbandes befinden.

DEFINITIONEN:

„Antimikrobiell“ bedeutet, daß die erfindungsgemäßen Proteine

- (i) das Wachstum und / oder die Proliferation von Mikroorganismen inhibieren und / oder verhindern und / oder
- (ii) die Mikroorganismen oder deren Strukturen zerstören.

„Antibiotisch“ bedeutet, daß die erfindungsgemäßen Proteine nachteilig auf die normalen biologischen Funktion der Mikroorganismen einwirken, wobei dieses Tod oder Zerstörung, ebenso auch Verhinderung von Wachstum oder Proliferation der Mikroorganismen, weiterhin auch Beeinträchtigung der Stoffwechselfunktionen bedeutet. Antibiotisch umfaßt somit den Begriff antimikrobiell. Eine antibiotische Wirkung kann auch bei Viren vorliegen. Daher umfaßt antibiotisch auch antiviral.

„Antiviral“ bedeutet, daß DNA - und RNA – Viren mit Hilfe der Proteine der Erfindung bekämpft werden können. Hierbei sind verschiedene Eingriffsmöglichkeiten sinnvoll. Die Viren in ihrer Ruheform können beeinflußt werden. Die Anhaftphase an oder das Eindringen in den Wirt kann gestört werden, der Aufenthalt oder die Vermehrung (temperente oder virulente Phase) in dem Wirt kann beeinträchtigt werden.

Die erfindungsgemäßen Proteine können auch zur Wundheilung eingesetzt werden.

„Wundheilung“ bedeutet, daß zum Beispiel die Kontraktion von Wunden beschleunigt wird, daß Bindegewebe im Wundbereich angesiedelt wird, daß Collagen angelagert wird. Ebenso sind Brandverletzung gut mit den Proteinen der Erfindung zu behandeln. Dabei kann ein Wundverband mit Proteinen angereichert sein oder Proteine von speziellen, insbesondere transfizierten Zellen im Wundverband exprimiert werden.

„Mikroorganismen“ umfassen die Prokaryonten mit Eubakterien und Archaeabakterien, die Pilze (Mycota mit Myxomyceten, Phycomyceten, und Eumyceten), die pflanzlichen und tierischen Einzeller, und Viren.

Der Ausdruck „Protein“ umfaßt alle Längen an Aminosäuresequenzen, somit auch Peptide. Dabei können sich die Proteine auch aus verschiedenen Ketten zusammensetzen, die durch kovalente Bindungen oder Van der Waal'sche Kräfte verbunden sind.

30

KOMBINATION MIT ANTIBIOTIKA:

Die erfindungsgemäßen Proteine können zusammen mit Antibiotika zum Beispiel aus der folgenden Gruppe verabreicht werden:
Bacitracin, Gramicidin, Polymyxin, Vancomycin, Teichoplanin, aminoglycoside, Penicillin, Monobactam.

35

Diagnostikum:

Die Erfindung umfaßt weiterhin die Verwendung von mindestens einem erfindungsgemäßen Protein zur Herstellung von Antikörpern oder Fragmenten davon.

5

Ebenfalls umfaßt die Erfindung die Verwendung von einem erfindungsgemäßen Antikörper oder Fragment davon als Diagnostikum.

Dabei sollen die erfindungsgemäßen Protein in Körpergeweben und Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden. Auch können damit

10 Nachweisverfahren durch Kopplung von Liganden an die erfindungsgemäßen Proteine hergestellt werden.

BEISPIELEBeispiel 1

Gewinnung von SAP-2

1.1. Isolierung:

5 50 g läisionaler Psoriasissschuppen wurde unter sauren Bedingungen bei Anwesenheit von Ethanol extrahiert und eingeengt. Dabei wurde dem Verfahren gefolgt, das beschrieben ist in J.M. SCHRÖDER, (1997) Methods in Enzymology, Vol 288. p 266 – 296.

Nach Diafiltrieren gegen 0,02 mol/l Natriumphosphatpuffer, pH 8 und 10 Zentrifugation wurde der Überstand an einer Bakterien – Affinitätssäule (*E. coli* oder *Staph. aureus*), die durch Kopplung hitze - inaktiverter (70 °C über eine Stunde) *E. coli* oder *Staphylococcus aureus* – Bakterien an N-hydroxy-succinimid – aktivierte Sepharose – Säule (Pharmacia) (10 x 5 mm) hergestellt worden war, chromatographiert.

15 Dazu wurde die Säule zunächst mit dem Äquilibrierungspuffer gewaschen und anschließend gebundene Proteine mit einem sauren Puffer (0,1 mol/l Glycin – Puffer, pH 3 mit 1 mol/l NaCl) eluiert.

Das gebundene Protein enthaltende Eluat wurde gegen 0,1 % wäßriger Trifluoressigsäure – Lösung diafiltriert und analog zur Isolierung von 20 chemotaktischen Peptiden (vgl. J.M. SCHRÖDER, (1997) Methods in Enzymology, Vol 288. p 266 – 296) zunächst einer präparativen Reversed Phase HPLC – Trennung unterzogen. 20µl der jeweiligen Fraktionen wurden lyophilisiert, in 5 µl einer 0,01 prozentigen wäßrigen Essigsäure – Lösung aufgenommen und mit Hilfe eines Plattendiffusions - Testsystems (siehe 25 Beispiel 3) (zur Identifikation antimikrobieller oder antibiotischer Proteine) analog zu M. E. SELSTED et al. (1993) J. Biol. Chem., Vol. 268, p 6641 – 6648 hinsichtlich der Anwesenheit antimikrobieller Peptide (mit *Staph. aureus* und *E. coli* als Test – Bakterium) analysiert.

30 Bei 40 % Acetonitril eluierte, antimikrobiell aktive Proteine wurden anschließend - analog zur Isolierung chemotaktischer Peptide (J.M. SCHRÖDER, (1997) Methods in Enzymology, Vol 288. p 266 – 296) - einer Mikro – Mono S – HPLC – Trennung mit Hilfe des Smart – HPLC – System unterzogen.

SAP-2 wurde bei 0,8 mol/l NaCl eluiert.

35 Eine anschließende Mikro – Reversed Phase – HPLC – Analyse mit Hilfe einer C – 18 RP – Säule ergab einen bei 52 % Acetonitril eluierenden Proteinpeak, der nach SDS – Gel - Elektrophorese (durchgeführt nach der Methode gemäß J.M. SCHRÖDER, (1997) Methods in Enzymology, Vol 288. p 266 – 296 eine

einzelne Proteinbande oder zwei Banden entsprechend der Mobilität von zirka 20 kDa ergab.

5

1.2. Sequenzierung von Fragmenten

Sequenzierungsversuche ergaben die aminotermrale Sequenz mit der Numerierung aus der vollständigen Sequenz.

10

Pro Lys Gly Met Thr Ser Ser Gln Trp Phe Lys Ile Gln His Met
5 10 15

15

Gln Pro Ser Pro Gln Ala Cys Asn Ser Ala Met Lys Asn Ile Asn
20 25 30

Lys His Thr Lys Arg Cys Lys Asp
35

20

Der Edman Abbau des Peptidfragments lieferte eine Sequenz , die dem C – Terminus entspricht:

Asp Ser Gln Gln Phe His Leu Val Pro Val
115 120

25

His Leu Asp Arg Val Leu
125

30

1.3. Biologische Aktivität von SAP-2: MIC

Antimikrobielle Aktivität gegen *Staph aureus*: < 100 µg/ml
gegen *E. coli*: < 50 µg/ml

RNase – Aktivität: 1.2 µg SAP – 2 verdaute in einer Stunde bei 37 °C zirka 5 µg humane RNA.

35

Beispiel 2

Gewinnung von SAP-3

2.1. Isolierung:

50 g läisionaler Psoriasischuppen wurden unter sauren Bedingungen bei Anwesenheit von Ethanol extrahiert und eingeengt. Dabei wurde dem Verfahren

gefolgt das beschrieben ist in J.M. SCHRÖDER, (1997) Methods in Enzymology, Vol 288. p 266 – 296.

Nach Diafiltrieren gegen 0,02 mol/l Natriumphosphatpuffer, pH 8 und Zentrifugation wurde der Überstand an einer Anti – IL – 8 – Affinitätssäule, die 5 durch Kopplung des monoklonalen anti – IL – 8 Antikörpers 52E4 an N-hydroxy-succinimid – aktivierte Sepharose – Säulen (Pharmacia) hergestellt worden war, chromatographiert. (analog zu J.M. SCHRÖDER, (1997) Methods in Enzymologie, Vol 287. p 216 – 230)

Dazu wurde die Säule zunächst mit dem Äquilibrierungspuffer gewaschen und 10 anschließend gebundene Proteine mit einem sauren Puffer (0,1 mol/l Glycin – Puffer, pH 3 mit 2 mol/l NaCl) eluiert.

Das gebundene Proteine enthaltende Eluat wurde gegen 0,1 % wäßriger Trifluoressigsäure – Lösung diafiltriert und analog zur Isolierung von 15 chemotaktischen Peptiden (vgl. J.M. SCHRÖDER, (1997) Methods in Enzymologie, Vol 288. p 266 – 296) zunächst einer präparativen Reversed Phase HPLC – Trennung unterzogen. 20µl der jeweiligen Fraktionen wurden lyophilisiert, in 5 µl einer 0,1 prozentigen wäßrigen Essigsäure – Lösung aufgenommen und mit Hilfe eines Plattendiffusions - Testsystems (siehe 20 Beispiel 3) (zur Identifikation antimikrobieller oder antibiotischer Proteine) analog zu M.E. SELSTED (1993) J Biol. Chem., Vol. 268, p 6641- 6648 hinsichtlich der Anwesenheit antimikrobieller Peptide (mit *Staph. aureus* oder *E. coli* als Test – Bakterien) analysiert.

25 Bei 37 % Acetonitril eluierte, antimikrobiell aktive Proteine wurden anschließend - analog zur Isolierung chemotaktischer Peptide (J.M. SCHRÖDER, (1997) Methods in Enzymologie, Vol 288. p 266 – 296) - einer Mikro – Mono S – HPLC – Trennung mit Hilfe des Smart – HPLC – System unterzogen.

SAP-3 wurde bei 0,79 mol/l NaCl eluiert.

30 Eine anschließende Mikro – Reversed Phase – HPLC – Analyse mit Hilfe einer C – 18 RP – Säule ergab einen bei 38 % Acetonitril eluierenden Proteinpeak, der nach SDS – Gel - Elektrophorese (durchgeführt nach der Methode gemäß J.M. SCHRÖDER, (1997) Methods in Enzymologie, Vol 288. p 266 – 296 eine 35 einzelne Proteinbande entsprechend der Mobilität von zirka 6 kDa ergab.

25

2.2. Sequenzierung von Fragmenten

Sequenzierungsversuche ergaben nur die aminotermrale Sequenz.

5	Gly Ile Ile Asn Thr Leu Gln Lys Tyr Tyr Cys Arg Val Arg Gly	10	15
	5		
10	Gly Arg Cys Ala Val Leu Ser Cys Leu Pro Lys Glu Glu Gln Ile	25	30
	20		
15	Gly Lys		
	32		

2.3. Biologische Aktivität von SAP-3: MIC

15 Antimikrobielle Aktivität gegen *Staph aureus*: < 100 µg/ml
 gegen *E. coli*: < 20 µg/ml

Beispiel 3

20 3. Bestimmung antimikrobieller Aktivität

3.1. Kultivierung der Mikroorganismen

Folgende Mikroorganismen wurden für die Versuche verwendet:

- *Escherichia coli* (*E. coli*) - ATCC (American Type Culture Collection) Nr. 11303
- 25 - *Pseudomonas aeruginosa* - ATCC Nr. 15442
- *Staphylococcus aureus* (Klinische Isolate der Hautklinik – Kiel)
- *Staphylococcus epidermidis* (Klinische Isolate der Hautklinik – Kiel)
- *Candida albicans* (Klinische Isolate der Hautklinik – Kiel)

30 Die Mikroorganismen wurden auf Trypticase-Soy-Broth (TSB) - Agarplatten bei 37°C kultiviert. Wurden sie längere Zeit nicht benötigt, lagerten sie bei 4°C. Für die Versuche wurde jeweils eine Einzelkolonie der entsprechenden Mikroorganismen in 40 ml TSB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (250 Upm) inkubiert. Zur Quantifizierung der Mikroorganismen 35 wurde die optische Dichte der Übernachtkulturen bei 620 nm (OD₆₂₀) gemessen und die Koloniezahl durch Ausplattieren von entsprechenden Verdünnungsstufen bestimmt

3.2. Plattendiffusions-Test

Um möglichst schnell und sensitiv Fraktionen der einzelnen chromatographischen Reinigungsschritte (vgl. 3.3.) auf antimikrobielle Aktivität zu untersuchen, wurde ein radialer Plattendiffusions-Test (vgl. Hiemstra et al., 1993) verwendet.

Um Bakterien aus einer logarithmischen Wachstumsphase zu erhalten, wurden 20 µl einer 40 ml Übernachtkultur von *E. coli* oder *Staphylococcus aureus* in 8 ml Trypticase – Soy – Broth (TSB) geimpft und 3,5 h bei 37°C inkubiert. Die 10 Bakterien wurden dann 10 min bei 1000 g abzentrifugiert, mit 4°C kalten Natrium-Phosphat-Puffer (10 mM, pH = 7,4) gewaschen, in 1 ml Natrium-Phosphat-Puffer resuspendiert und durch Bestimmung der OD₆₂₀ quantifiziert. Etwa 1x10⁶ Bakterien wurden dann in 8 ml vorgewärmtes (42 °C) Agarose - Medium gegeben, welches sich aus 1% Agarose in Natrium-Phosphat-Puffer + 15 1% TSB-Medium (v/v) + 0,03% Tween 80 (v/v) zusammensetzte. Nach Einfüllen dieses mit Bakterien versetzten Agarose-Mediums in eine Petrischale (Ø = 10cm ;Sarstedt, Newton) und anschließender Abkühlung bei Raumtemperatur, wurden in die nun verfestigte Agaroseschicht Löcher von 3 mm Durchmesser gestanzt. In diese Löcher wurden dann 5 µl der zu testenden 20 Substanz in 0,01% Essigsäure gegeben.

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde die Agaroseschicht mit 42°C warmen 2 x TSB-Medium + 1 % Agarose überschichtet und bei 37°C inkubiert. Nach ca. 20 bis 24 Stunden konnte man die Hemmhöfe der antimikrobiellen oder antibiotischen Fraktionen im Bakterienrasen deutlich erkennen. Die 25 relativen antimikrobiellen oder antibiotischen Aktivitäten wurden durch den jeweiligen Durchmesser der Hemmhöfe bestimmt.

3.3. Flüssigkultur-Test

Um den dosisabhängigen Wirkungsbereich eines antimikrobiellen oder 30 antibiotischen Proteins abschätzen zu können, wurde ein Flüssigkulturstestsystem verwendet (vgl. Ganz et al., 1985).

Etwa 10 µl einer 1×10^7 /ml-Verdünnung der entsprechenden Mikroorganismen in Natrium-Phosphat-Puffer (vgl. 3.1.) wurden zu 80 µl Natrium-Phosphat-Puffer zusammen mit 1,25% TSB - Medium (v/v) gegeben. Hinzugefügt wurden 10 µl 0,01% Essigsäure mit den entsprechenden Konzentrationen des

5 antimikrobiellen oder antibiotischen Proteins (100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, und 6,25 µg/ml).

Diese Ansätze wurden in einer 96-Loch-Platte (Becton Dickinson, Heidelberg) 3 h bei 37°C unter leichtem Schütteln (150 Upm) inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden von je 50 µl der Ansätze zehnfache Verdünnungsreihen

10 mit Natrium-Phosphat-Puffer erstellt und jeweils in 3 Parallelens auf TSB-Agarplatten ausplattiert (100 µl). Nach 24 bis 36 Stunden Wachstum wurden die Kolonien ausgezählt.

Als Kontrolle wurde je ein Ansatz nur mit 10 µl 0,01% Essigsäure (ohne Protein) einmal direkt vor der Inkubation und einmal nach 2 h Inkubation bei 37°C

15 ausplattiert.

4. Versuchsergebnisse

SAP-3 wurde in den angegebenen Konzentrationen bei 37°C für 3 Stunden mit 5 • 10^4 KBE/ml (KBE = koloniebildende Einheiten) von *E. coli* und

20 *Staphylococcus aureus* in 100 µl 10 mM Natriumphosphat - Puffer (pH = 7,4) zusammen mit 1% TSB inkubiert (TSB = Trypticase-Soy-Broth). Die antimikrobielle Aktivität von SAP-3 wurde durch Auszählung der KBE am nachfolgenden Tag bestimmt. Zuvor wurden 100 µl der jeweiligen Ansätze in zehnfachen Verdünnungsstufen) auf TSB – Platten ausplattiert. Danach wurden

25 die Platten bei 37°C über Nacht inkubiert.

Es ergibt sich für *E. coli* und *Staphylococcus aureus* eine LD₉₀ von 2,5 - 5 µg/ml (LD₉₀ = letale Dosis von 90%; gibt den Konzentrationsbereich der jeweiligen antimikrobiellen Substanz an, bei dem es zu einer 90%-igen Reduktion der eingesetzten koloniebildenden Einheiten nach dreistündiger Inkubation mit

30 dieser antimikrobiellen Substanz kommt).

SAP-2 wurde in den angegebenen Konzentrationen bei 37°C für 3 Stunden mit 1 • 10^5 KBE / ml der jeweiligen Mikroorganismen in 100 µl 10 mM

Natriumphosphat - Puffer (pH = 7,4) zusammen mit 1% TSB inkubiert. Die antimikrobielle Aktivität von SAP-2 wurde durch Auszählung der KBE am nachfolgenden Tag bestimmt. Zuvor wurden 100 µl der jeweiligen Ansätze in zehnfachen Verdünnungsstufen) auf TSB – Platten ausplattiert. Danach wurden 5 die Platten bei 37°C über Nacht inkubiert.

Es ergibt sich eine LD₉₀ von 4 - 7,5 µg/ml für *Propionibacterium acnes*; 7,5 - 15 µg/ml für *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa*; weiterhin 15 - 30 µg/ml für *Candida albicans*.

10

Beispiel 5**5. Biochemische Charakterisierung antimikrobieller oder antibiotischer Proteine mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

15

Zur Bestimmung der relativen Molekülmasse wurde die Tricine-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet (Schägger und Jagow, 1987), welche es gestattet, kleine Proteine unter 10 kDa sehr effizient aufzutrennen.

20

Die Durchführung geschah nach dem Protokoll der Autoren (Schägger und Jagow, 1987) in einer vertikalen Gelelektrophoresekammer, wobei ein 16,5% Polyacrylamidgel mit einem Anteil von 6% Bisacrylamid und 6 M Harnstoff verwendet wurde.

25

Die Proben wurden vor dem Auftrag durch 0, 1 M DTT und Aufkochen denaturiert. Als molekularer Größenmarker diente der Standard S-17 (Sigma, St.Louis, USA). Nach dem Elektrophoreselauf wurde das Gel einer Silberfärbung unterzogen:

30

- Zuerst wurde das Gel 30 min fixiert (30% Ethanol, 10% Eisessig).
- Anschließend erfolgte eine 30 min Inkubation in "Farmer's reducer"-Lösung.
- Dann wurde das Gel 3 x 10 min mit H₂O gewaschen und 20 min in Silbernitratlösung gefärbt.
- Abschließend erfolgte eine 10-15 min Inkubation in Entwickler-Lösung.
- Die Entwicklung wurde durch 5% Essigsäure abgestoppt und das Gel anschließend photographiert.

Für eine schnelle Analyse der HPLC-Fraktionen wurde das SDS-Page-Phast-System (Pharmacia, Freiburg) mit fertigen High-Density-Gelen (Pharmacia) nach Angaben des Herstellers benutzt. Als Größenmarker diente der S-17-Marker von Sigma (s.o.). Die Detektion der aufgetrennten Moleküle erfolgte mit
5 der oben beschriebenen Silberfärbung.

PATENTANSPRÜCHE:

1. Protein,
5 das als aktives, reifes Protein / Peptid (Protein) einer der folgenden Sequenzen aufweist:
SEQ ID NO: 1 (Sequenz Protokoll Nr. 1) (SAP-2); oder
SEQ ID NO: 2 (Sequenz Protokoll Nr. 2) (SAP-3);
oder
10 das als aktives, reifes Protein allelische Modifikationen einer der zuvor unter a)
genannten Aminosäure - Sequenzen aufweist, wobei mindestens eine Aminosäure der
Aminosäure - Sequenz substituiert, deletiert oder insertiert ist, ohne dabei die Aktivität
des aktiven Proteins wesentlich zu beeinflussen,
oder
15 das als aktives, reifes Protein posttranskriptionale Modifikationen einer der Sequenzen
unter a) und b) aufweist, die nicht wesentlich die Aktivität des aktiven Proteins
beeinflussen.
2. Protein nach Anspruch 1, das antimikrobiell und / oder antibiotisch wirksam ist.
20
3. Protein nach Anspruch 1 oder 2, das eine Mobilität von 6 kDa in der SDS –
Gelelektrophorese aufweist.
4. Protein, das eine Signalsequenz und ein reifes Protein nach einem der
25 vorherigen Ansprüche umfaßt,
wobei das Protein eine der folgenden Sequenzen aufweist:
SEQ ID NO: 3 (PreSAP-2); oder
SEQ ID NO: 4 (PreSAP-3);
oder
30 wobei das Protein allelische Modifikationen einer der zuvor unter d) genannten
Aminosäure - Sequenzen aufweist, wobei wenigstens eine Aminosäure der Aminosäure
- Sequenz substituiert, deletiert oder insertiert ist, ohne dabei die Aktivität des reifen
aktiven Proteins wesentlich zu beeinflussen,
oder
35 wobei das Protein posttranskriptionale Modifikationen einer der Sequenzen unter d) und
e) aufweist, die nicht wesentlich die Aktivität des aktiven reifen Proteins beeinflussen.

5. Protein nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei an dem N - Terminus und / oder C - Terminus Schutzgruppen angeordnet sind.
6. Protein nach einem der vorherigen Ansprüche, welches ein rekombinantes
5 Protein ist.
7. cDNA oder DNA,
wobei die cDNA oder DNA eine der folgenden Aminosäure - Sequenzen kodiert:
SEQ ID NO: 1 (SAP-2);
10 SEQ ID NO: 2 (SAP-3);
SEQ ID NO: 3 (PreSAP-2); oder
SEQ ID NO: 4 (PreSAP-3)
oder
wobei die cDNA oder DNA allelische Modifikationen einer der Aminosäure - Sequenzen
15 unter aa) kodiert,
worin wenigstens eine Aminosäure der Aminosäure - Sequenz substituiert, deletiert
oder insertiert ist, ohne dabei die Aktivität des aktiven Proteins wesentlich zu
beeinflussen.
- 20 8. cDNA oder DNA nach Anspruch 7, wobei, die cDNA oder DNA ein reifes Protein
kodiert.
9. cDNA oder DNA,
wobei die cDNA oder DNA eine der folgenden Nukleotidsequenzen aufweist:
25 SEQ ID NO: 5; (cDNA-SAP-2)
SEQ ID NO: 6; (cDNA-SAP-3);
oder
wobei die cDNA oder DNA eine allelische Modifikation einer der Nukleotidsequenzen
unter cc) aufweist, wobei wenigstens ein Nukleotid substituiert, deletiert oder insertiert
30 ist, ohne dabei die Aktivität des Proteins, das von der allelischen Modifikation der
Nukleotidsequenz unter cc) kodiert wird, wesentlich zu beeinflussen.
10. cDNA oder DNA,
wobei die cDNA oder DNA eine der folgenden Nukleotidsequenzen besitzt:
35 SEQ ID NO: 7; (cDNA-PreSAP-2) oder
SEQ ID NO: 8 (cDNA-PreSAP-3),
oder

wobei die cDNA oder DNA eine allelische Modifikation einer der Nukleotidsequenzen unter ee) aufweist, wobei wenigstens ein Nukleotid substituiert, deletiert oder insertiert ist, ohne dabei die Aktivität des Proteins, das von der allelischen Modifikation der Nukleotidsequenz unter ee) kodiert wird, wesentlich zu beeinflussen.

5

11. Vektor, der eine cDNA oder DNA nach einem der Ansprüche 7 bis 10, weiterhin einen passenden Promotor und gegebenenfalls einen passenden Enhancer enthält.

12. Vektor nach Anspruch 11 in einer eukaryontischen oder prokaryontischen
10 Wirtszelle, die mit dem Vektor transformiert ist.

13. Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 6 als pharmazeutischer
Wirkstoff.

15 14. Pharmazeutische Zusammensetzung, die eines der Proteine nach einem
der Ansprüche 1 bis 6 oder ein Gemisch davon enthält, in Gegenwart von
pharmazeutisch verträglichen und annehmbaren Verbindungen und Trägern.

20 15. Verfahren zum Synthetisieren von einem der Proteine nach einem der
vorherigen Ansprüche 1 bis 6, wobei nach der Festphasen – Methode oder nach
der Flüssigphasen – Methode die Proteine synthetisiert werden.

25 16. Bindungsmoleküle, Einzelketten - Proteine, Antikörper oder Fragmente
der Antikörper, die Domänen auf dem reifen Protein nach einem der vorherigen
Ansprüche 1 bis 6 spezifisch erkennen.

30 17. Verwendung eines der Proteine nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder
deren Gemisch zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von
Infektionen, die von Mikroorganismen verursacht wurden oder zur Prävention
solcher Infektionen.

18. Wundverband

mit mindestens einem Protein nach einem der vorherigen Ansprüche 1 bis 6
oder

35 mit syngenen oder allogenen humanen Zellen, die mit der DNA oder cDNA nach
einem der Ansprüche 7 bis 10 transfiziert sind.

19. Verwendung von mindestens einem Protein nach einem der vorherigen Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung von Antikörpern oder Fragmenten davon.
20. Verwendung von einem Antikörper oder Fragment davon nach Anspruch
5 19 als Diagnostikum.

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

NAME: Schering Aktiengesellschaft
STRASSE: Müllerstraße 178
STADT: Berlin
STAAT: Deutschland
POSTLEITZAHL: D-13342
TELEPHON: 030 / 4681 2515
TELEFAX: 030 / 4681 2058

(ii) TITEL DER ANMELDUNG: Humane antibiotische Proteine

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 8

(iv) COMPUTER LESBARE FORM:

MEDIUM TYP: Floppy Disk

COMPUTER: IBM PC kompatibel

ARBEITSSYSTEM: OC - DOS / MS – DOS

(2) INFORMATION ZU DEN SEQUENZEN

SEQ ID NO: 1

ART DER SEQUENZ: Aminosäure - Sequenz

SEQUENZLÄNGE: 128 Aminosäuren

5 ART DES MOLEKÜLS: reifes Protein SAP-2

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Hornschuppen von Psoriasis Patienten

EIGENSCHAFTEN: antibiotisches Protein

Lys Pro Lys Gly Met Thr Ser Ser Gln Trp Phe Lys Ile Gln His
5 10 15

10 Met Gln Pro Ser Pro Gln Ala Cys Asn Ser Ala Met Lys Asn Ile
20 25 30

Asn Lys His Thr Lys Arg Cys Lys Asp Leu Asn Thr Phe Leu His
15 35 40 45

Glu Pro Phe Ser Ser Val Ala Ala Thr Cys Gln Thr Pro Lys Ile
50 55 60

20 Ala Cys Lys Asn Gly Asp Lys Asn Cys His Gln Ser His Gly Pro
65 70 75

Val Ser Leu Thr Met Cys Lys Leu Thr Ser Gly Lys Tyr Pro Asn
80 85 90

25 Cys Arg Tyr Lys Glu Lys Arg Gln Asn Lys Ser Tyr Val Val Ala
 85 100 105

30 Cys Lys Pro Pro Gln Lys Lys Asp Ser Gln Gln Phe His Leu Val
110 115 120

Pro Val His Leu Asp Arg Val Leu
125

35 SEQ ID NO: 2

ART DER SEQUENZ: Aminosäure - Sequenz

SEQUENZLÄNGE: 45 Aminosäuren

ART DES MOLEKÜLS: reifes Protein SAP-3

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Hornschuppen von Psoriasis Patienten

40 EIGENSCHAFTEN: Funktion von einem antibiotischen Protein
Gly Ile Ile Asn Thr Leu Gln Lys Tyr Tyr Cys Arg Val Arg

Gly Arg Cys Ala Val Leu Ser Cys Leu Pro Lys Glu Glu Gln Ile
35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50

Gly Lys Cys Ser Thr Arg Gly Arg Lys Cys Cys Arg Arg Lys Lys

Gly Lys Cys Ser Thr Arg Gly Arg Lys Cys Cys Arg Arg Lys Lys

SEQ ID NO: 3

ART DER SEQUENZ: Aminosäure - Sequenz

SEQUENZLÄNGE: 156 Aminosäuren

5 ART DES MOLEKÜLS: Präprotein SAP-2, Protein mit Signalsequenz

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Hornschuppen von Psoriasis Patienten

EIGENSCHAFTEN: antibiotisches Protein

	Met Ala Pro Ala Arg Ala Gly Phe Cys Pro Leu Leu Leu Leu		
10	-25	-20	-15
	Leu Leu Gly Leu Trp Val Ala Glu Ile Pro Val Ser Ala Lys Pro		
	-10	-5	-1 1
15	Lys Gly Met Thr Ser Ser Gln Trp Phe Lys Ile Gln His Met Gln		
	5	10	15
	Pro Ser Pro Gln Ala Cys Asn Ser Ala Met Lys Asn Ile Asn Lys		
20	20	25	30
	His Thr Lys Arg Cys Lys Asp Leu Asn Thr Phe Leu His Glu Pro		
	35	40	45
25	Phe Ser Ser Val Ala Ala Thr Cys Gln Thr Pro Lys Ile Ala Cys		
	50	55	60
	Lys Asn Gly Asp Lys Asn Cys His Gln Ser His Gly Pro Val Ser		
	65	70	75
30	Leu Thr Met Cys Lys Leu Thr Ser Gly Lys Tyr Pro Asn Cys Arg		
	80	85	90
	Tyr Lys Glu Lys Arg Gln Asn Lys Ser Tyr Val Val Ala Cys Lys		
	95	100	105
35	Pro Pro Gln Lys Lys Asp Ser Gln Gln Phe His Leu Val Pro Val		
	110	115	120
	His Leu Asp Arg Val Leu		
40	125		

SEQ ID NO: 4

ART DER SEQUENZ: Aminosäure - Sequenz
 SEQUENZLÄNGE: 67 Aminosäuren
 ART DES MOLEKÜLS: Präprotein, d.h. das reife Protein SAP-
 5 mit Signalsequenz

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Hornschuppen von Psoriasis Patienten

EIGENSCHAFTEN: als reifes Protein Funktion von einem
antibiotischen Protein

10	Met Arg Ile His Tyr Leu Leu Phe Ala Leu Leu Phe Leu		
	-20	-15	-10

15	Val Pro Val Pro Gly His Gly Gly Ile Ile Asn Thr Leu Gln Lys		
	-5	-1 1	5

20	Tyr Tyr Cys Arg Val Arg Gly Gly Arg Cys Ala Val Leu Ser Cys		
	10	15	20

25	Leu Pro Lys Glu Glu Gln Ile Gly Lys Cys Ser Thr Arg Gly Arg		
	25	30	35

30	Lys Cys Cys Arg Arg Lys Lys	
	40	45

SEQ ID NO: 5

ART DER SEQUENZ: Nukleotidsequenz
 SEQUENZLÄNGE: 384 Nukleotide
 ART DES MOLEKÜLS: reifes Protein kodierende cDNA für SAP-2
 URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Hornschuppen von Psoriasis Patienten
 EIGENSCHAFTEN: antibiotisches Protein kodierende cDNA

35	AAG CCC AAG GGC ATG ACC TCA TCA CAG TGG TTT AAA ATT CAG CAC 045	
	ATG CAG CCC AGC CCT CAA GCA TGC AAC TCA GCC ATG AAA AAC ATT 090	

40	AAC AAG CAC ACA AAA CGG TGC AAA GAC CTC AAC ACC TTC CTG CAC 135	
	GAG CCT TTC TCC AGT GTG GCC ACC TGC CAG ACC CCC AAA ATA 180	

45	GCC TGC AAG AAT GGC GAT AAA AAC TGC CAC CAG AGC CAC GGG CCC 225	
	GTG TCC CTG ACC ATG TGT AAG CTC ACC TCA GGG AAG TAT CCG AAC 270	

50	TGC AGG TAC AAA GAG AAG CGA CAG AAC AAG TCT TAC GTA GTG GCC 315	
	TGT AAG CCT CCC CAG AAA AAG GAC TCT CAG CAA TTC CAC CTG GTT 360	

CCT GTA CAC TTG GAC AGA GTC CTT

384

SEQ ID NO: 6

ART DER SEQUENZ: Nukleotidsequenz

SEQUENZLÄNGE: 135 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS: das reife Protein kodierende cDNA für SAP-3

5 URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Hornschuppen von Psoriasis Patienten

EIGENSCHAFTEN: antibiotisches Protein kodierende cDNA

GGA ATC ATA AAC ACA TTA CAG AAA TAT TAT TGC AGA GTC AGA GGC 045

10

GGC CGG TGT GCT GTG CTC AGC TGC CTT CCA AAG GAG GAA CAG ATC 090

GGC AAG TGC TCG ACG CGT GGC CGA AAA TGC TGC CGA AGA AAG AAA 135

15

SEQ ID NO: 7

ART DER SEQUENZ: Nukleotidsequenz

SEQUENZLÄNGE: 468 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS: Präprotein kodierende cDNA für SAP-2, SAP-2 mit
20 Signalsequenz

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Hornschuppen von Psoriasis Patienten

EIGENSCHAFTEN: antibiotisches Protein kodierende cDNA

ATG GCA CCG GCC AGA GCA GGA TTC TGC CCC CTT CTG CTG CTT CTG 045

25

CTG CTG GGG CTG TGG GTG GCA GAG ATC CCA GTC AGT GCC AAG CCC 090

AAG GGC ATG ACC TCA TCA CAG TGG TTT AAA ATT CAG CAC ATG CAG 135

30

CCC AGC CCT CAA GCA TGC AAC TCA GCC ATG AAA AAC ATT AAC AAG 180

CAC ACA AAA CGG TGC AAA GAC CTC AAC ACC TTC CTG CAC GAG CCT 225

TTC TCC AGT GTG GCC GCC ACC TGC CAG ACC CCC AAA ATA GCC TGC 270

35

AAG AAT GGC GAT AAA AAC TGC CAC CAG AGC CAC GGG CCC GTG TCC 315

CTG ACC ATG TGT AAG CTC ACC TCA GGG AAG TAT CCG AAC TGC AGG 360

40

TAC AAA GAG AAG CGA CAG AAC AAG TCT TAC GTA GTG GCC TGT AAG 405

CCT CCC CAG AAA AAG GAC TCT CAG CAA TTC CAC CTG GTT CCT GTA 450

CAC TTG GAC AGA GTC CTT

468

45

SEQ ID NO: 8

ART DER SEQUENZ: Nukleotidsequenz

SEQUENZLÄNGE: 201 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS: das Präprotein kodierende cDNA für SAP-3

5

(Signalsequenz und reife Protein)

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Hornschuppen von Psoriasis Patienten

EIGENSCHAFTEN: antibiotisches Protein kodierende cDNA

10 ATG AGG ATC CAT TAT CTT CTG TTT GCT TTG CTC TTC CTG TTT TTG 045
GTG CCT GTC CCA GGT CAT GGA GGA ATC ATA AAC ACA TTA CAG AAA 090
TAT TAT TGC AGA GTC AGA GGC GGC CGG TGT GCT GTG CTC AGC TGC 135
15 CTT CCA AAG GAG GAA CAG ATC GGC AAG TGC TCG ACG CGT GGC CGA 180
AAA TGC TGC CGA AGA AAG AAA 201